

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ  
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995  
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

REC'D 09 AUG 2004

WIPO

PCT

Наш № 20/12-377

“6” июля 2004 г.

## СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2003118500 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в июне месяце 23 дня 2003 года (23.06.2003).

**Название изобретения:**

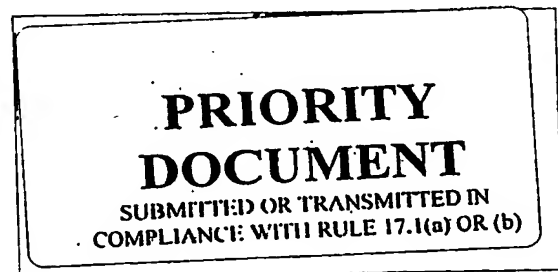
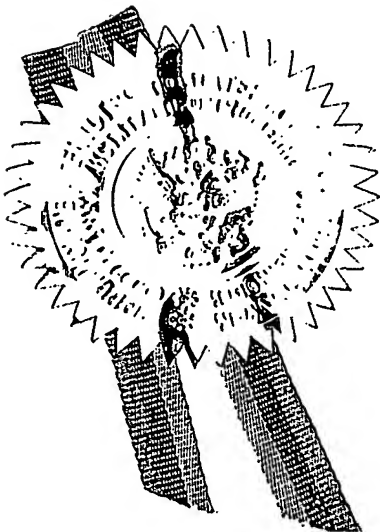
Средство для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, способ его получения, фармацевтическая композиция и способ ингибирования вирусных инфекций

**Заявитель:**

Закрытое акционерное общество «Деско»

**Действительные авторы:**

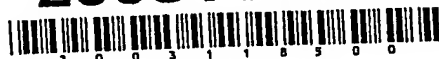
РАСНЕЦОВ Лев Давидович  
ШВАРЦМАН Яков Юделевич  
ЛЯЛИНА Ирина Константиновна  
РАСНЕЦОВА Бетти Ефимовна



Заведующий отделом 20

А.Л.Журавлев

BEST AVAILABLE COPY



Средство для ингибирования репродукции оболочечных вирусов,  
способ его получения, фармацевтическая композиция  
и способ ингибирования вирусных инфекций.

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и касается создания средства для ингибирования репродукции оболочечных вирусов.

Настоящее изобретение касается соединений и их фармацевтически приемлемых солей, вызывающих торможение репродукции оболочечных вирусов таких как: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), тип 1, вирус герпеса простого (*Herpes simplex virus*) (ВПГ), тип 1, вирус гепатита С (ВГС), 1 в генотип.

В настоящее время исследования ведутся по разработке терапии и методов лечения вирусных инфекций, особенно вызванных ВПГ, ВГС, ВИЧ/СПИД и связанного со СПИД комплекса (КСС). Больные СПИДом, иммунная система которых перестает функционировать, страдают от многочисленных оппортунистических инфекций, таких как *Pneumocystis carinii* и *Candida albicans*, а также ВПГ, ВГС, цитомегаловируса (ЦМВ) или некоторых видов опухолей (саркома Капоши), которые и становятся непосредственной причиной смерти. Способ лечения СПИДа неизвестен, и текущая терапия в большинстве случаев применяется без достаточных доказательств эффективности и имеет неблагоприятные побочные эффекты.

ВИЧ характеризуется высокой генетической и, следовательно, антигенной изменчивостью. Штаммы ВИЧ, полученные даже от одного и того же больного, но на разных стадиях его заболевания, могут отличаться по антигенным свойствам и нуклеотидным последовательностям. Наблюдается отличие штаммов в разных климатогеографических зонах. Это осложняет химиотерапию, иммунотерапию и вакцинопрофилактику СПИДа.

Проблемы при лечении ВГП инфекций возникают из-за способности этих вирусов персистировать в латентной или покоящейся форме. Когда первичная инфекция стихает или отступает, вирус, в основном, остается в латентной форме в чувствительных нервных ганглиях, которые иннервируют место первичной инфекции. Определяющий период латентности неизвестен, кроме того, этот период может быть нарушен перегревом, охлаждением, солнечным облучением, гормональными и эмоциональными отклонениями или иммуносупрессивными средствами, приводя, в основном, к повторной инфекции.

Большинство антивирусных средств, используемых до сих пор для лечения ВГП - инфекций, были веществами, которые вмешиваются в синтез вирусной ДНК. Эти вещества включают идоксуридин, цитозин, арабиноза, аденинарабинозид и трифтортимидин. Такие вещества вмешиваются также и в сходные функции клетки-хозяина, что приводит к проблемам клеточной токсичности и, как следствие, невозможности систематического использования у людей. В настоящее время основным лекарственным средством для лечения инфекций, вызванных ВГП, является ацикловир, который имеет сильное противовирусное действие и низкую токсичность. Однако слабая растворимость и появление лекарственно устойчивых вирусов ограничивает применение этого средства.

Химиотерапия СПИДа связана в настоящее время с созданием и применением ингибиторов обратной транскриптазы, а также ингибиторов протеазы ВИЧ.

Ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ имеют или нуклеозидную природу: зидовудин (AZT, ретровир), эпивир (ЗТС, ламивудин), видекс (ddI, дидианозин), хивил (ddC, зальцитабин), зерит (d4T, ставудин), абакавир (ABC, зиаген), комбивир (зидовудин + эпивир), тризивир (абакавир + эпивир + зидовудин), или ненуклеозидную: делавирдин (рескриптор), невирапин (вирамон), эфавиренц (сустина), или нуклеотидную: тенофовир, виреад. В

России зарегистрирован отечественный препарат фосфазид. Эти препараты токсичны и для макроорганизма, поскольку они вмешиваются в геномные структуры. Обратная транскриптаза осуществляет синтез вирусной ДНК в течение всего срока заболевания, поэтому ингибиторы ревертазы ВИЧ необходимо использовать пожизненно.

Ингибиторы протеазы ВИЧ представлены в настоящее время несколькими препаратами: саквинавир (инвираза), индинавир (криксиван), ритонавир (норвир), нельфинавир (вирасепт), ампренавир (агенераза), калетра (лопинавир+ритонавир). Протеаза ВИЧ ответственна за созревание (процессинг) вирусных белков. Нарушение процессинга гликопротеинов приводит к неспособности вирионов ВИЧ присоединяться к CD4+клетке.

В настоящее время существует термин «терапия третьей линии» для характеристики лечения больных ВИЧ/СПИД, у которых возбудитель оказался резистентным по крайней мере к одному лекарству из каждого класса препаратов или у кого лечение при использовании двух различных схем терапии оказалось неэффективным. Такую высоко активную антиретровирусную терапию (ВААРТ) обозначают также терминами "мега-ВААРТ" или "гига-ВААРТ". Терапия третьей линии включает применение одновременно четырех антиретровирусных препаратов с различными механизмами блокирования репродукции ВИЧ - нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы, и ингибиторы протеазы. При этом сложнее прогнозировать возможные негативные взаимодействия различных лекарств, в результате - резко увеличивается вероятность развития побочных реакций и осложнений. В таких случаях необходим постоянный мониторинг концентрации лекарств в сыворотке крови, что является дорогостоящей процедурой. Необходимость дополнения терапевтического курса препаратами, подавляющими активность возбудителей сопутствующих инфекций, еще больше осложняет лечебный процесс.

Известные лекарственные препараты позволяют контролировать течение болезни, но не излечивать пациентов, страдающих СПИДом. Создание лекарственных средств, которые могут излечивать или по меньшей мере обеспечивать лучшую защиту от смертоносного вируса продолжается и связано как с поиском новых соединений, способных тормозить репродукцию вируса при помощи известных механизмов, так и с разработкой новых подходов к решению задачи.

Расширяется спектр препаратов для лечения больных ВИЧ/СПИД. В настоящее время на стадии клинических исследований находятся следующие препараты: эмтрицитабин, DAPD (нуклеозидные аналоги), каправирин, ТМС-120 (ненуклеозидные). Внимание привлекают также новые ингибиторы протеазы: атазанавир (зривада), типранавир, мозенавир. Ведутся исследования по созданию препаратов совершенно новых классов: ингибиторы интегразы (S-1360), а также ингибиторы слияния (пентафузид (T-20 или Fuzeon)), T-1249, PRO-542, и ингибиторы рецепторов хемокинов (SCH-C и PRO-140). Однако результаты испытаний неоднозначны. Так, препарат SCH-C вызывал увеличение интервала QT в ЭКГ здоровых испытуемых при использовании максимальной дозы, что является указанием на возможные кардиологические осложнения. Ингибиторы слияния представляют собой полипептиды: T-20 состоит из 36 остатков природных аминокислот, T-1249 – из 39. Использование этих препаратов ограничено внутривенным введением, в результате приема у некоторых больных, получавших T-20, образовывались подкожные узелки, эпизодически отмечались подкожные инфекции и абсцессы.

Большинство известных наиболее опасных вирусов: ВПГ, ВГС, ЦМВ и ВИЧ являются типичными представителями оболочечных вирусов. Инфицирование клетки-хозяина оболочечными вирусами изначально основывается на взаимодействии различных рецепторов на поверхности клетки-хозяина с гликопротеинами вируса. Затем вирусная и клеточная

мембраны сливаются, и содержимое вириона вливается в цитоплазму клетки-хозяина. Вмешательство в образование вирусного оболочечного белка могло бы предотвратить первичное взаимодействие вируса и клетки-хозяина и последующее слияние, а также тормозить формирование вирионов. В патенте № 2196602 показано, что под действием солей фуллеренаминокапроновой и масляной кислот происходило подавление репликативной активности ЦМВ за счет ингибции позднего структурного белка gV.

Особого внимания заслуживают высокополимерные полианионные природные соединения – пептидогликаны, декстраны, полисахариды и др. Эти соединения мало токсичны, способны адсорбировать вирусные частицы и служить ксенобиотической «ловушкой» вирионов ВИЧ. Эти вещества препятствуют образованию синцитиума, но прямого воздействия этих лекарств на инфекционность вируса не было установлено (Европейские заявки 04065512 и 0467185). Высказывается предположение, что сульфонированные полимочевины (патент № 2160746) мол массой от 2000 до 4000 подавляют активность ВИЧ, ВПГ и ЦМВ по следующему механизму: анионные группы синтетических олигомеров связываются с вирусом и/или клеточной мембраной и тем самым прерывается способность вируса к репликации.

Известные лекарственные средства, в основном, подавляют одну из специфических функций вируса. В патенте (WO 95/19949, C07C 49/223, 1995) впервые была показана возможность воздействия одним соединением на две мишени: на протеазу и обратную транскриптазу ВИЧ. В патенте № 2196602 впервые предложен способ ингибирования одновременно двух вирусов: ВИЧ и ЦМВ. Ингибирование осуществляли по механизму блокирования активного сайта на молекуле протеазы и обратной транскриптазы, и позднего структурного белка gV ЦМВ человека. В обоих патентах использовали соединения – производные фуллерена.

В последнее время биологическая активность фуллеренов привлекает внимание в связи с возможностью использования их в борьбе против вирусов. Основное препятствие на пути создания лечебных препаратов связано с нерастворимостью фуллеренов в воде, что затрудняет их прямое введение в организм человека.

Известны способы получения водорастворимых форм фуллерена за счет образования аддукта с поливинилпирролидоном (Kiselev O.I. et al. // Mol. Materials. 1998. V.11. P.121; Piotrovsky L.B. et al. // Ibidem. 2000. V.13. P.41.). Показана его эффективность против вируса гриппа А- и В-типа.

Известен также способ получения фуллеренов, включающий смешивание предварительно растворенных в органическом растворителе фуллеренов с полимерной матрицей в хлороформе, выпаривание смеси под вакуумом до полного удаления растворителей, растворение полученного комплекса в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4 – 7,6) с последующей обработкой продукта ультразвуком (RU №2162819, 02.10.01). При этом в качестве водорастворимой полимерной матрицы используют мембранные кефалины.

Продукты, полученные в результате таких модификаций, являются не стабильными соединениями с ограниченными возможностями хранения.

Перспективным является получение водорастворимых производных фуллерена путем химического присоединения к нему различных радикалов. Аналогами настоящего изобретения являются соединения, и способы их получения, описанные в патентах WO 95/19949, C07C 49/223, 1995, РФ №2196602, РФ №2124022.

Известно соединение, содержащее водорастворимое производное фуллерена с общей формулой  $C_{60}-X=HOC(O)(CH_2)_2C(O)NH(CH_2)_2$  (публ. WO 95/19949, C07C 49/223, 1995). В качестве заместителей используются любые алкиловые или арил – алкиловые заместители, в частности те, которые замещаются азотом или кислородом, содержащим от 1 до 20 атомов

углерода. Однако данное соединение имеет низкую растворимость в воде, равную 1 мг/мл, и способ его получения сложный.

В патенте РФ №2196602 предложен способ ингибирования репродукции ВИЧ и ЦМВ-инфекций при помощи соединений на основе аминокислотных и дипептидных производных фуллерена. В качестве аминокислотного производного фуллерена использованы натриевые соли фуллеренаминокапроновой и фуллеренаминомасляной кислот.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату является соединение N-(моногоидро)-фуллеренаминокапроновая кислота  $\text{HC}_{60}\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$  (патент РФ № 2124022).

Для его получения к раствору фуллерена в о-дихлорбензоле добавляют водный раствор калиевой соли аминокaproновой кислоты и 18-краун-6. Реакционную массу перемешивают 6-8 часов при 60°C. Затем растворители отгоняют, остаток обрабатывают насыщенным раствором хлористого калия и остаток фуллеренового производного промывают водой. Выход целевого продукта количественный. Полученная N-(моногоидро)-фуллеренаминокапроновая кислота растворима в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, пиридине.

Недостатками данного синтеза являются: условия реакции взаимодействия фуллерена  $\text{C}_{60}$  и калиевой соли аминокaproновой кислоты в двухфазной системе приводят к увеличению времени процесса, кроме того, используемый в качестве солубилизатора 18-краун-6 имеет высокую стоимость.

Выход целевого продукта составляет не более 5% от массы затраченного на синтез фуллерена, а продукты обладают не воспроизводимыми свойствами.

Недостатком предложенного способа является то, что часть продукта образуется в виде нерастворимого в воде соединения.



Во всех описанных ранее патентах были получены продукты моноприсоединения фуллерена и аминокислот и пептидов. Однако фуллерены имеют большое число эквивалентных реакционных центров по количеству двойных связей, что дает возможность образования продуктов полиприсоединения.

Задачей настоящего изобретения является получение продукта с максимально возможным числом замещенных групп, обеспечивающих высокую растворимость.

Для решения поставленной задачи предложена группа изобретений, объединенных единым изобретательским замыслом: средство, представляющее собой соединение фуллеренполикарбонных анионов, способ его получения, фармацевтическая композиция, включающая указанное средство и способ ингибирования репродукции оболочечных вирусов.

В результате взаимодействия фуллерена с солью аминокислоты в среде органического растворителя в присутствии полиалкиленоксида получены фуллеренполикарбонные анионы общей формулы I.



где  $C_{60}$  – фуллереновое ядро,

$NH(CH_2)_mC(O)O^-$  - аминокарбонный анион

$m$  равно целому числу от 1 до 5, предпочтительно 3 и 5, наиболее предпочтительно 5

$n$  равно целому числу от 2 до 12, предпочтительно от 4 до 6, наиболее предпочтительно 6.

Молекулярный вес связан со значением  $n$  и  $m$  полученных соединений и равен соответственно:

$n$  равной 6 и  $m$  равной 5, фуллеренгексааминокапронового аниона  $C_{60}H_6[NH(CH_2)_5C(O)O^-]_6$  равен 1500 г/моль.

Для получения средства к раствору фуллерена в о-дихлорбензоле (толуоле или любом другом органическом растворителе) вносят

аминокислоту в виде соли (калиевой или натриевой), затем добавляют солюбилизатор. Порядок внесения в реакционную среду аминокислоты и солюбилизатора не важен, можно вносить их в виде комплекса, предварительно смешав. В качестве солюбилизатора используют различные полиалкиленоксиды: полиэтиленгликоли мол массы от 150 до 400, и выше 400 (например, ПЭГ-1500), а также полиэтиленгликоли, имеющие свободные концевые группы, но и с замещенными (например, полиэтиленгликоль диметилловый эфир мол массы 500).

Для увеличения скорости реакции добавляют любой сильный восстановитель (щелочные металлы).

Соотношение фуллерена и аминокислоты увеличено более чем в 50 раз. При соотношении менее чем в 50 раз получаются соединения с меньшей растворимостью и более высокой токсичностью.

Оптимальная температура проведения синтеза –  $+(60-80)^{\circ}\text{C}$ .

Превращение в желаемую фармацевтически приемлемую соль, особенно натриевую или калиевую, может выполняться путем обработки кислоты подходящим основанием или путем добавления соли слабой летучей кислоты. В частности, нерастворимая в воде фуллеренполикарбоновая кислота превращается в более предпочтительные фармацевтически приемлемые соли, такие как натриевая соль, которые растворимы в воде. Добавление соли слабой летучей кислоты происходит путем обработки раствора солью щелочного металла и слабой летучей кислоты. При концентрировании раствора путем выпаривания или лиофилизации слабая кислота удаляется, а фуллеренполикарбоновые кислоты выделяются в виде их солей щелочных металлов. Примерами солей щелочных металлов и слабой летучей кислоты являются натрия и калия карбонат или бикарбонат.

Выход целевого продукта составляет более 200 % по взятому фуллерену. Целевой продукт по данному изобретению характеризуется

постоянством состава, содержание в целевом продукте основного вещества составляет не менее 87,8 %.

Соединения формулы 1 - темно-коричневые кристаллические вещества, неограниченно растворимые в воде в солевой форме и практически не растворимые в воде в кислотной форме. В кислотной форме они ограниченно растворяются в смесях  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  1:1 и  $i\text{-PrOH}-\text{H}_2\text{O}$  1:1, хорошо - в DMSO. При нагревании до  $350^\circ\text{C}$  они не плавясь, разрушаются.

Особенностью строения полученных соединений является наличие в молекуле нескольких карбоксильных групп, которые в зависимости от pH среды, находятся или в солевой, или в кислотной форме, проявляя буферные свойства. pH образования полной соли - 7,9; pH образования полной кислоты - 4,0, при этом кислота вследствие малой растворимости в воде образует мицеллы, коллоид и выпадает в осадок.

pH перехода заявленных соединений в растворенное состояние (образования истинного раствора) - 5,0-6,0. При этом образуются 1-2-х замещенные соли.

При значениях pH 5,0÷7,9 вследствие гидролиза соли с различной степенью замещения находятся в динамическом равновесии.

ТСХ выполнялась на силикагеле 60F<sub>254</sub> фирмы "Merck". Наилучшие результаты по разделению компонентов были получены с системами элюентов: EtOH-бензол- $\text{H}_2\text{O}$  4:1:1 (I) и 4:1:1,5 (II).

В (I) системе было обнаружено 3 пятна с  $R_f$  0,68, 0,37 и на старте, в системе (II) - 3 пятна с  $R_f$  0,82, 0,71 и 0,47- последнее принадлежит полярному компоненту. Проба с нингидрином показала отсутствие в составе продукта компонентов в продукте с первичной аминогруппой.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разделяемые ТСХ вещества принадлежат различным формам, находящимся в динамическом равновесии, соотношение которых зависит от pH и полярности растворителя. Это может происходить при гидролизе неполных солей.

фуллеренполикарбоновых кислот. Ширина хроматографического пятна (зоны) каждого компонента указывают о химической (структурной) однородности вещества.

Были изучены  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектры растворов соединений формулы 1 в дейтрированных растворителях с различной сольватирующей способностью. Спектры сняты при  $20^\circ\text{C}$  на приборе WM-200 с рабочей частотой 200,13 МГц по  $^1\text{H}$  и 50,32 МГц по  $^{13}\text{C}$ .

$^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 25,2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), 25,4 ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), 26,8 ( $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), 69,5 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 130-160 ( $\text{C}_{60}$ ), 183,7 ( $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ).

$^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1,16д (1H,  $J=6,0$  Гц,  $-\text{NH}-$ ), 1,26; 1,45 и 1,65 (3м, 1H, 2H, 3H соответственно,  $-(\text{CH}_2)_3-$ ), 2,18; 2,23 (2с, 0,2H,  $-\text{NH}\dots$ ), 2,34т (2H,  $J=7,2$  Гц,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), 2,94ушир.т. (0,4H,  $J=6,0$  Гц,  $J=1,8$  Гц,  $-\text{NCH}_2-$ ), 3,6м (1H,  $J=1,8$  Гц,  $J=6,0$  Гц,  $\text{C}_{60}\text{H}$ ).

$^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,02д (0,4H,  $J=6,0$  Гц,  $-\text{NH}-$ ), 1,22; 1,32 и 1,52 (3м, 6H,  $-(\text{CH}_2)_3-$ ), 1,90; 2,08 (2с, 0,3H каждый,  $-\text{NH}\dots$ ), 2,20т (2H,  $J=7,2$  Гц,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), 2,68кв. (2H,  $-\text{NCH}_2-$ ), 7,46м; 8,17с (0,5H каждый,  $\text{C}_{60}\text{H}$ ), 12,08уш.с (1H,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ).

$^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,25м; 1,49м (2H, 4H, соответственно,  $J=7,8$  Гц,  $J=6,9$  Гц,  $-(\text{CH}_2)_3-$ ), 1,88д (0,1H,  $J=1,6$  Гц,  $-\text{NH}\dots$ ), 1,89д (0,1H,  $J=5,5$  Гц,  $-\text{NH}\dots$ ), 2,05д (0,1H,  $J=1,6$  Гц,  $-\text{NH}\dots$ ), 2,24т (2H,  $J=7,3$  Гц,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), 2,82уш.т (1,5H,  $J=1,6$  Гц,  $J=7,5$  Гц,  $-\text{NCH}_2-$ ), 3,49м; (1H,  $J=5,5$  Гц,  $\text{C}_{60}\text{H}$ ).

Следующие свойства предлагаемых соединений обусловлены присутствием фуллеренового ядра в молекуле. Обилие изолированных кратных связей позволяет считать фуллерен полиолефиновой системой. Для него наиболее типично присоединение по кратной связи. Он легко присоединяет нуклеофилы и свободные радикалы, что делает возможным использование подобных веществ в качестве антиоксидантов.

Технический результат изобретения состоит в том, что создан новый класс соединений – фуллеренполикарбоновых анионов общей формулы 1 за

счет нуклеофильного присоединения к фуллерену аминокислоты по нескольким двойным связям с количеством двух и более аминокислот.

Соединения обладают новыми свойствами:

- неограниченной растворимостью в воде,
- высокой биодоступностью,
- высокой эффективностью воздействия на инфицированные клетки,
- низкой токсичностью.

Показано, что антиоксидантные свойства заявляемых соединений незначительно зависят от их концентрации. При увеличении концентрации в 40 раз – с 5 до 200 мкг/мл – антиоксидантная активность увеличилась с 22,78 до 32,21 процентов. Таким образом, соединения даже в низких концентрациях работают с максимально возможной эффективностью.

Противовирусная активность препарата была изучена в отношении ВИЧ, ВПГ, гепатит С.

Соединения формулы 1 в концентрации 1 мкг/мл обеспечивали полную защиту перевиваемых лимфобластоидных клеток человека МТ-4 от вирусного цитопатического действия (ЦПД) ВИЧ-1, взятого в дозе 100 ЦПД<sub>50</sub> до 7 суток наблюдения после заражения клеточных культур. В концентрации 10 мкг/мл происходит исчезновение вируса (антиген р24) в культуральной среде. В этих концентрациях цитотоксическое действие препарата на клетки не обнаружено.

Соединения формулы 1 в концентрации 10 мкг/мл обеспечивали полную защиту клеток перевиваемой культуры почек обезьян (VERO) и культуры фибробластов эмбриона человека (М-21) от цитодеструктивного действия вируса простого герпеса (ВПГ-1), взятого в дозе 100 ЦПД<sub>50</sub>, через 48 часов после заражения клеточных культур. В течение того же времени в контрольных инфицированных клеточных культурах, не подвергшихся воздействию предложенных соединений, происходила 100 % гибель клеток.

Соединения формулы 1 в концентрации 10 мкг/мл, внесенные в момент инфицирования, обеспечивали полную защиту перевиваемой культуры клеток аденокарциномы надпочечника человека SW-13 от цитодеструктивного действия вируса гепатита С (1в генотип), взятого в дозе 100 ЦПД<sub>50</sub>. Жизнеспособность инфицированных клеток оставалась на уровне неинфицированного контроля. Установлено полное отсутствие остаточной инфекционности вируса на 3-й день после заражения клеток при использовании предложенных соединений в концентрации 100 мкг/мл, в концентрации 10 мкг/мл инфекционный титр потомства вируса (ИД<sub>50</sub>) снизился с 4,8 lg в контроле до 1,5 lg.

Установлен эффект торможения пролиферации опухолевых клеток человека под воздействием данных соединений.

Установлена ингибирующая концентрация (ИК<sub>50</sub>) препарата на опухолевые клетки человека МТ-4 и Нер 2, равная 100 мкг/мл. Показано, что в этой концентрации препарат оказывает влияние на биосинтетические процессы в культуре клеток, вызывая выраженное торможение пролиферации клеток и подавление синтеза белков.

Присутствие препарата в культуральной среде в концентрации 100 мкг/мл изменяет метаболизм клеток Нер 2, что проявляется в подавление синтеза белков. Уже после 1 суток воздействия наблюдается исчезновение двух белков – с мол массой 90 кДа и 50 кДа. После 3-х суток наблюдения в контрольных культурах отмечено появление нового белка с мол массой около 100 кДа, присутствие сохранялось и на 6 сутки. В культуре, находящейся под воздействием препарата, синтез этого белка отсутствовал.

Было показано, что соединения формулы 1 связываются с альбуминами (максимальная концентрация составила 240 мкг/мл) и в таком виде легко транспортируются в различные органы и ткани. Анализ данных по тканевой доступности, характеризующий интенсивность проникновения препарата в периферические ткани, показал, что препарат проникает во все

органы. Наиболее интенсивно в печень, селезенку, почки и легкие. Предлагаемые соединения в отличие от других плохо растворимых в воде производных фуллерена мало проникают в сальник и мозг и не вызывают нейротоксичности.

Эти соединения имеют достаточно низкий молекулярный вес для того, чтобы проходить через экскреторную мембрану клеток. Имея способность неограниченно растворяться в воде, соединения достаточно быстро выводятся из организма. Изучение экскреции препарата показало, что за трое суток с мочой выводится 52-54% от введенной дозы; скорость экскреции при внутривенном и ректальном способах введения одинакова.

Влияние препарата на ферментативную систему биотрансформации ксенобиотиков в печени крыс оценивали по изменению активности ферментов: альдегиддегидрогеназы, НАДФН цитохром С редуктазы, N-деметилазы, анилингидроксилазы, полученных из надмитохондриальной фракции печени, и содержания P450 и B5 при ректальном введении животным препарата в двух дозах 0,3 и 3,0 мг/кг. Не установлено дозозависимого влияния на активность изученных ферментов и содержание P450 и B5 в печени крыс после однократного введения препарата в течение 17 дней. Было показано статистически достоверное увеличение активности глутатионтрансферазы в печени крыс на 1 сутки после введения препарата по сравнению с контрольными, получавшими плацебо, и интактными животными.

Соединения формулы 1 не обладают иммунотоксическим действием. При применении в дозах до 15 мг/кг заявляемые соединения не обладают мутагенным действием на теплокровных животных. ЛД<sub>50</sub> для нелинейных мышей составила при внутривенном введении для самок - 83 мг/кг, для самцов - 114 мг/кг, при внутрибрюшинном - 688 мг/кг для самок и самцов, при внутрижелудочном - >2700 мг/кг и при ректальном - >450 мг/кг.

Фармацевтические готовые формы препаратов соединений формулы 1 могут быть выполнены в форме для орального или парентерального назначения для терапии или профилактики вирусных инфекций и состояний, при которых показано применение антиоксидантов и антидотов.

Соединения смешивают с обычными фармацевтическими носителями и эксципиентами и используют в форме таблеток, капсул, свечей, мазей, растворов для инъекций и т.д. Композиции, включающие соединения формулы 1, содержат примерно 0,1-90 % по массе активного соединения, наиболее предпочтительно 0,5-10 %.

Соединения настоящего изобретения могут применяться орально, парентерально (включая подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, внутриягодичные инъекции или вливания), путем ингаляционного распыления или ректально, включающей традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, стимуляторы и вспомогательные агенты.

Такие фармацевтические композиции могут выпускаться в виде орально применяемых суспензий или таблеток; назальных спреев; стерильных препаратов для инъекций, например в виде стерильных водных или масляных суспензий для инъекций, или свечей.

Для орального применения в виде суспензий композиции готовят согласно методам, широко известным в области приготовления фармацевтических рецептур, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу для обеспечения массы, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего агента, метилцеллюлозу в качестве усилителя вязкости и подслащивающие агенты и/или отдушки, известные в этой области. В виде таблеток немедленного выделения такие композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, кальций фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие эксципиенты, связывающие вещества,



расширители, дезинтеграторы, разбавители и смазывающие вещества, известные в данной области.

При применении в виде назальных аэрозолей или путем ингаляции такие композиции готовят методами, хорошо известными в области фармацевтических рецептов, и они могут выпускаться в виде растворов на физиологическом растворе, с использованием бензойной кислоты или других подходящих консервантов, промоторов адсорбции для усиления биоприменимости, и/или других солюбилизующих или диспергирующих агентов, известных в данной области.

Растворы или суспензии для инъекций могут формироваться согласно известным методам, с использованием нетоксичных, парентерально применимых разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлористого натрия или подходящих диспергирующих или смачивающих и суспендирующих агентов, таких как стерильные, мягкие, устойчивые масла, включая синтетические моно- или диглицериды, или жирные кислоты, включая олеиновую кислоту.

При ректальном применении в виде свечей такие композиции могут готовиться путем смешивания лекарства с таким нераздражающим эксципиентом, как масло какао, синтетические глицеридные сложные эфиры или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми веществами при обычных температурах, но сжижаются и/или растворяются в ректальной полости с выделением лекарства.

Предлагаемые соединения могут быть использованы для лечения инфекций, вызываемых ВИЧ, ВПГ, гепатитом С.

Лечение инфекционных заболеваний путем воздействия фармацевтически приемлемых доз соединениями по формуле 1 осуществляется одновременно на несколько вирусов (в случае микст-инфекций) и затрагивает различные стадии репликации вируса. Показано,

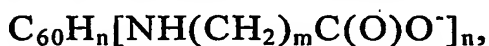
что лечение сопровождается снижением стрессового эффекта на введение препарата, усилением антиоксидантной защиты организма от инфекций, выведением из организма токсинов. Интоксикация организма характерна для течения ряда вирусных инфекций и обуславливает тяжесть заболевания.

Расчетные данные показали, что уровни дозировок порядка 0,1-250 или 2500 мг/день могут использоваться для лечения или профилактики указанных выше состояний, причем оральные дозировки в 2-5 раз выше. Однако следует иметь в виду, что конкретный уровень дозировок и частота приема лекарства для каждого конкретного пациента будет зависеть от большого числа факторов, включая активность конкретного соединения, метаболическую стабильность и длительность действия, скорость выделения, возраст пациента, вес тела, общее состояние здоровья, пол, лекарственные комбинации.

Возможны сочетания соединений формулы 1 с другими антивирусными агентами, иммуномодуляторами, противоинфекционными агентами или вакцинами в различных комбинациях с любыми фармацевтическими составами, предназначенными для лечения.

## Формула изобретения

1. Средство для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующееся тем, что оно представляет собой водорастворимое соединение фуллеренполикарбоновых анионов общей формулы



где  $C_{60}$  – фуллереновое ядро,

$NH(CH_2)_mC(O)O^-$  - аминокарбоновый анион

$m$  равно целому числу от 1 до 5, предпочтительно 3 и 5, наиболее предпочтительно 5,

$n$  равно целому числу от 2 до 12, предпочтительно от 4 до 6, наиболее предпочтительно 6.

2. Способ получения средства для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующийся тем, что в раствор фуллерена в о-дихлорбензоле вносят аминокислоту в виде калиевой или натриевой соли, далее добавляют солубилизатор выбранный из группы полиалкиленоксидов: полиэтиленгликоли мол массы от 150 до 400 и выше, а также диметилвые эфиры полиэтиленгликолей, при этом соотношение фуллерена и кислоты увеличено более чем в 50 раз, а синтез проводят при температуре 60-80° С.

3. Фармацевтическая композиция для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующаяся тем, что она содержит средство по п.1 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемые наполнители.

4. Фармацевтическая композиция для ингибирования репродукции оболочечных вирусов по п. 3, характеризующаяся тем, что она выполнена в форме таблеток, капсул, раствора для инъекций, суппозиториев, мази, крема, спрея, геля.

✓ 5. Способ ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующийся тем, что используют фармацевтическую композицию по пп. 3 и 4 для подавления вирусов при лечении заболеваний ВИЧ и СПИД, герпес-инфекций, вирусного гепатита С.

## РЕФЕРАТ

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и касается создания средства для ингибирования репродукции оболочечных вирусов.

Технической задачей настоящего изобретения является создание средства на основе фуллеренполикарбоновых анионов для подавления активности оболочечных вирусов при лечении заболеваний, вызываемых этими вирусами.

Для решения поставленной задачи предложена группа изобретений, объединенных общим изобретательским замыслом, включающая в себя способ получения соединений, изучение механизмов действия, создание фармацевтических композиций и разработку методов лечения с их применением.

Решение поставленной задачи достигается выбором таких количественных соотношений компонентов и условий проведения реакции, которые обеспечивают получение продуктов полиприсоединения. Установлено, что при проведении синтеза количество аминокислоты должно превышать количество фуллерена более чем в 50 раз.

Продукт, полученный по предложенному способу, имеет неограниченную растворимость в воде, необходимую биодоступность, высокую эффективность воздействия на инфицированные клетки, низкую токсичность. Содержание основного вещества в целевом продукте составляет не менее 87%. Процесс технологичен и может быть использован в фармацевтической промышленности.

Разработаны композиции лекарственных средств и способы лечения заболеваний, вызванных ВИЧ/СПИД, герпес-инфекциями, вирусным гепатитом С.